

Application of dual stable isotope techniques to measure absorption of calcium, magnesium and iron in man

Citation for published version (APA):

van den Heuvel, E. G. H. M. (1998). *Application of dual stable isotope techniques to measure absorption of calcium, magnesium and iron in man*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Ponsen & Looijen. <https://doi.org/10.26481/dis.19980619eh>

Document status and date:

Published: 01/01/1998

DOI:

[10.26481/dis.19980619eh](https://doi.org/10.26481/dis.19980619eh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Deficiency of minerals and trace elements in humans and animals is often caused by a low bioavailability rather than by a low or deficient intake of these nutrients. Bioavailability can be defined as the fraction of the ingested nutrient that is absorbed and utilized for normal physiological functions or storage. One of the main determinants of bioavailability is absorption. This can be defined as the percentage of the element ingested that, after the digestion of food, has passed the mucosal cells and is taken up by the blood circulation.

Food ingredients that may stimulate or inhibit the absorption of minerals and trace elements are currently receiving much attention. Development in food technology, molecular biology and nutrition science has led to a growing market for novel and functional foods. Novel foods are just new foods, whereas functional foods are foods with specific additional beneficial effects on health or specific physiological functions. Some functional foods are also novel foods.

Before novel foods can enter the market their safety has to be assessed. Such assessments encompass safety from a toxicological as well as a nutritional point of view. The assessment of nutritional safety may include the effects of novel foods on bioavailability of minerals and trace elements. Before any claim of beneficial effects of functional foods on health can be put forward its functionality has to be demonstrated. This may include positive effects on bioavailability of minerals and trace elements.

This thesis deals with the development and application of new techniques (using stable isotopes) to measure the intestinal absorption of minerals and trace elements. Our aim was twofold: first, to develop a new method to measure iron absorption with a minimum use of stable isotopes in order to reduce the costs of the method, and second, to study the influence of several potential functional food ingredients on mineral and trace element absorption, using the dual stable isotope technique. The minerals and trace elements involved are calcium, magnesium and iron. The potential functional food ingredients involved are bovine lactoferrin, non-digestible oligosaccharides and lactulose.

A review of the literature on different methods for measuring Fe absorption by using

isotopes can be found in Chapter 2. From this review it has been concluded that the method of choice for measuring Fe absorption appears to be the analysis of the incorporation of both an orally and an intravenously administered stable Fe isotope into erythrocytes, within 14 days after isotope administration. The only disadvantage of this method is the rather large amount of stable isotopes required in order to obtain a significant isotope enrichment in erythrocytes. Stable isotopes are expensive and, moreover, the amount of isotopes should not interfere with the maintenance of physiological conditions during absorption tests. Our idea was that a reduction in the dose could be obtained by measuring the incorporation of the isotopes into a reticulocyte-rich erythrocyte fraction. It is known that ca. 80% of newly absorbed Fe is incorporated into red blood cells within 2 weeks after administration. About half of that amount is present in young erythroid cells in the circulating blood after 3 to 4 days of administration. As erythrocytes live about 110 days, and every day only 0.9% of this cell population is replaced, the isotopes in the newly formed erythrocytes will be diluted strongly when they enter the circulation in the form of reticulocytes, the youngest erythroid cells. By preparing cell fractions rich in young erythroid cells it should be possible to find a higher isotope enrichment. Therefore, in blood drawn 3 to 14 days after oral and intravenous administration of two different stable Fe isotopes, reticulocyte-rich cell fractions were isolated by using a density separation method. In these cell fractions isotope enrichment was measured. The first effort, as described in Chapter 3, resulted in a significant enrichment of the intravenously administered isotope. However, no enrichment of the orally given isotope was found. The order in which the stable isotopes in this experiment were administered, might have interfered with the absorption of the orally given isotope.

In our second experiment the order of isotope administration was reversed; so that the oral dose of stable Fe isotopes was given ca. two hours before the intravenous dose (Chapter 4). Compared to the enrichment found in whole blood after 14 days, in reticulocyte-rich cell fractions a three-times higher isotope enrichment was found of both the orally and intravenously administered stable Fe isotopes. The absorption based on the isotope enrichment values in the reticulocyte-rich cell fractions was essentially the same as the absorption calculated from the isotope enrichment in

whole blood. Because of the higher enrichment, the required dose of stable isotopes can be reduced to one-third of the doses used in the traditional method without loss of sensitivity. When labour is included this will result in a total cost savings of 35% for women and 55% for men.

Because the development of the new technique to measure true Fe absorption with the isolation of reticulocytes, stagnated, the traditional method with erythrocytes was used to measure the effect of bovine lactoferrin (Lf) and non-digestible oligosaccharides (NDO) on Fe absorption. Lactoferrin is a major iron-binding protein in milk from many species. Long-term feeding animal experiments as well as in vitro cell receptor studies have indicated that under conditions of increased iron needs, Lf promotes iron absorption. Therefore, in women with low iron stores the effect of bovine Lf, which may bind specifically to human target cells, on iron absorption was measured using the double stable isotope technique. Four treatments were given, which consisted of 3 different doses of bovine Lf and a control treatment. The Lf doses were chosen in such way that Lf was differently saturated with Fe. The results of this study are described in Chapter 5. Neither an inhibitory nor a promoting effect of bovine Lf on Fe absorption was found. However, we cannot exclude completely the possibility that we have missed small treatment effects (an increase in absorption of less than about 8%) due to the high within-subject variability in true intestinal Fe absorption. Nevertheless, the average absorption percentages of each treatment with a different Lf dose and of the control treatment were almost identical and no dose-effect relationship was present. We think this makes a positive effect of bovine Lf on Fe absorption unlikely.

Next to favourable effects of the ingestion of NDO on gastrointestinal function (faecal bulking, production of short-chain fatty acids) and metabolism (reduction of serum cholesterol, improved tolerance to glucose) positive effects of NDO on the absorption of minerals and trace elements have been found in rats. Therefore, we investigated the effect of 15 g of inulin, fructo-oligosaccharides (FOS), or galacto-oligosaccharides per day on Fe and Ca absorption in healthy men. As described in

Chapter 6, neither an inhibitory nor a promoting effect on Fe and Ca absorption was found, which is relevant in view of safety of these functional food compounds. From studies on the bioavailability of Fe from a diet it appears that the effects of dietary variables that influence Fe absorption are particularly clear under conditions of a low Fe status of the body. The powerful control of Fe absorption against Fe overload of the body could explain why till now no effect of NDO on Fe absorption was found in human subjects. Therefore, we cannot exclude the possibility that NDO beneficially influences Fe absorption in man when Fe stores are low.

In these adult men, Ca absorption was measured by using the dual stable isotope technique. The enrichment of both isotopes was measured in a 24-h urine sample. It is possible that the slower late colonic component of Ca absorption, on which NDO probably exert their effect, has not reached completion within 24 hours. Besides, a positive effect could be more pronounced in young growing volunteers, due to their higher Ca requirements. Therefore, in the second study on NDO, 15 g of FOS was given to twelve healthy boys and urine collection was extended. As described in Chapter 7, 15 g of FOS stimulated Ca absorption. From the results of both studies described in Chapter 6 and 7, we may conclude that the FOS-induced enhancement may be dependent on the subject's Ca requirement and may take place predominantly in the large intestine.

Like NDO, lactulose is mostly fermented in the distal part of the intestinal tract. Possibly by a same mechanism, this synthetic disaccharide can stimulate Ca absorption. As no results of human studies on the influence of lactulose on Ca absorption are available, a study was conducted in a population group (postmenopausal women) who may benefit from the envisaged enhancing effect of lactulose on Ca absorption. As described in Chapter 8, the treatments consisted of 5 and 10 g of lactulose per day and a control treatment. Lactulose increased Ca absorption in postmenopausal women, without increasing urinary Ca excretion. This indicates that lactulose may also increase the uptake of Ca by the bones and/or inhibit bone resorption. The positive effect on Ca absorption was significantly related to the dose of lactulose. More research is warranted to explore how lactulose stimulates Ca

absorption and whether it is able to improve the Ca balance in man and/or to decrease the rate of ageing bone loss.

As a consequence of fermentation of NDO in the large intestine short-chain fatty acids (SCFA) are produced and the pH decreases. This may play a role in the stimulating effect of NDO on both Ca and Mg absorption. Therefore, we also investigated the effect of 15 g of FOS on Mg metabolism in seven boys (Chapter 9). Although a common mechanism of the positive effect of FOS on Ca and Mg metabolism seemed to exist, FOS did not affect Mg metabolism in these adolescents. However, we should admit that the number of subjects in this study may have been too small to detect moderate effects. Moreover, since our study was performed only with an oral administration of a stable isotope and not by the application of a dual stable isotope technique (oral and intravenous administration), no final conclusion about the potential effects of FOS on Mg absorption can be drawn and further research into the role of FOS on Mg absorption in humans is recommended.

Referring to the aims mentioned in the introductory chapter of this thesis, the following conclusions are drawn:

- By measuring isotope enrichment in isolated young erythroid cells, Fe absorption can be determined with a smaller amount of administered stable isotopes than by measuring isotope enrichment in whole blood (the traditional method). The former procedure saves money and avoids interference with maintenance of physiological conditions during absorption tests.
- Our results did not provide evidence for a positive effect of bovine lactoferrin on Fe absorption in persons with low Fe stores.
- Our results showed that the bioavailability of Ca can be increased in adolescents by a feasible dose of 15 g/d of fructo-oligosaccharides. Besides, the intake of non-digestible oligosaccharides, such as inulin, fructo-oligosaccharides and galacto-oligosaccharides, does not adversely affect Fe, Ca or Mg absorption.
- In postmenopausal women, 10 g/d of lactulose stimulates Ca absorption.

Samenvatting

Een tekort aan mineralen en spoorelementen kan worden veroorzaakt door een lage biologische beschikbaarheid zonder dat er sprake is van een tekort van deze elementen in de voeding. Biologische beschikbaarheid wil zeggen dat deel van het ingenomen element dat via de darm wordt opgenomen en wordt benut door het lichaam. Momenteel is er veel aandacht voor voedingsstoffen die mogelijk de absorptie kunnen stimuleren of remmen. Voedingsmiddelen met deze (soms nieuwe) voedingsstoffen worden ook wel 'functional foods' genoemd. Dit zijn voedingsmiddelen die met opzet zo zijn samengesteld dat ze ten opzichte van de traditionele voedingsmiddelen een gezondheidsbevorderend effect hebben, zoals bijvoorbeeld 'een positief effect op de biologische beschikbaarheid van mineralen en spoorelementen'. Voordat er zo'n claim over een gezondheidsbevorderend effect aan een 'functional food' kan worden toegekend, dient de claim voldoende onderbouwd te zijn met wetenschappelijke bewijzen. In de experimenten beschreven in dit proefschrift werd daarom onderzocht of de 'functional foods', lactoferrine en niet-verteerbare koolhydraten, de absorptie van mineralen en spoorelementen bij de mens beïnvloeden. Het was al bekend dat deze 'functional foods' de absorptie bij dieren verhogen.

Methoden om absorptie te meten

Om de invloed van verschillende 'functional foods' op de opname van mineralen en spoorelementen nauwkeurig te kunnen bepalen dient gebruik te worden gemaakt van radioactieve of stabiele isotopen. Vanwege het gevaar van blootstelling van de proefpersoon aan radioactiviteit, komen radioactieve isotopen voor het voedingsonderzoek bij gezonde proefpersonen niet in aanmerking. Daarom is in het in dit proefschrift beschreven onderzoek gebruik gemaakt van stabiele isotopen. Het onderzoek heeft zich geconcentreerd op de absorptie van de elementen calcium, magnesium en ijzer.

Stabiele isotopen

Elk element bestaat van nature uit isotopen. De stabiele isotopen van calcium, ijzer of magnesium, welke het minst voorkomen in de natuur, zijn gebruikt in onze

onderzoeken. Een mengsel van isotopen van het betreffende element met daarin een grote hoeveelheid van dit minst voorkomend stabiele isotoop is commercieel verkrijgbaar. Wanneer zo'n verrijkt mengsel wordt toegediend aan het lichaam wordt de natuurlijke verhouding van de stabiele isotopen in het lichaam veranderd. In de door ons toegepaste methode, de zogenaamde dubbel-label techniek, werd van één element twee stabiele isotopen gegeven, één met de voeding en een ander werd direct in de bloedbaan geïnjecteerd (intraveneuze toediening, dus 100% absorptie). Een deel van het geïnjecteerde of geabsorbeerde calcium of magnesium wordt uitgescheiden via de urine. Uit de verhouding van de stabiele isotopen in de urine kan de absorptie van calcium of magnesium worden berekend.

Voor ijzer ligt dit iets anders. De uitscheiding van ijzer via de urine is veel te laag om deze te kunnen gebruiken voor metingen van ijzerabsorptie. Wel is het mogelijk ijzer in de rode bloedcellen te meten. Het overgrote deel van het opgenomen ijzer wordt namelijk ingebouwd in rode bloedcellen. Daarom kan uit de verrijking van de rode bloedcellen met stabiele isotopen, de absorptie van ijzer worden berekend. Het nadeel van deze methode is dat een relatief grote hoeveelheid aan stabiele ijzerisotopen nodig is om een voldoende en goed meetbare verrijking van de rode bloedcel te verkrijgen. Dit maakt de methode behoorlijk duur, terwijl er gevaar bestaat dat de grote dosis interfereert met de normale weg van ijzer door het lichaam. Daarom zijn we op zoek gegaan naar een betere methode.

Nieuwe methode

Tachtig procent van het opgenomen ijzer wordt binnen 2 weken ingebouwd in de rode bloedcellen en met name in de jonge rode bloedcellen. Daar rode bloedcellen ongeveer 110 dagen leven en elke dag maar 1% van deze cellen wordt vervangen, wordt de verrijking van de jonge rode bloedcellen met het ingebouwde stabiele ijzerisotoop sterk verdund door het al aanwezige ijzer in de oudere rode bloedcellen. Uit de experimenten beschreven in hoofdstukken 3 en 4 blijkt het mogelijk om jonge rode bloedcellen van de oude rode bloedcellen te scheiden. Hierdoor kan verdunning worden voorkomen en is het mogelijk een hogere verrijking met de stabiele isotopen te verkrijgen. De absorptie, berekend op basis van de verrijking van de jonge rode

bloedcellen (nieuwe methode), was gelijk aan de absorptie, berekend uit de verrijking van alle rode bloedcellen (traditionele methode). Aangezien de verrijking van de jonge rode bloedcellen drie keer zo hoog was als bij de traditionele methode, is in de nieuwe methode een veel lagere dosis aan stabiele ijzerisotopen nodig. Hierdoor kunnen de kosten worden gereduceerd.

Helaas kostte de ontwikkeling van de nieuwe methode meer tijd dan verwacht. Daarom is in de experimenten, beschreven in de volgende alinea's, nog gebruik gemaakt van de traditionele methode om ijzerabsorptie te meten.

Effecten van 'functional foods'

Het doel van de volgende experimenten was het nagaan van effecten van potentiële 'functional foods' op de absorptie van ijzer, calcium of magnesium. De bestudeerde 'functional foods' waren lactoferrine uit koemelk en de niet-verteerbare koolhydraten.

Lactoferrine

Lactoferrine is een eiwit dat voorkomt in melk. Naast bacterie-dodende eigenschappen, wordt aan lactoferrine het verhogen van de ijzerabsorptie toegekend, indien er sprake is van een ijzertekort. Dit laatste is echter gebaseerd op dierexperimenten. Wij wilden nagaan of lactoferrine uit koemelk ook de ijzerabsorptie stimuleert bij mensen met een ijzertekort. Daartoe kregen vrouwen met een lage ijzervoorraad drie verschillende hoeveelheden lactoferrine. Geen positief effect op de ijzerabsorptie werd gevonden, maar we kunnen niet uitsluiten dat we kleine effecten van lactoferrine op de ijzerabsorptie ($< 8\%$) hebben gemist, doordat de ijzerabsorptie binnen personen erg varieerde. Desondanks was er nagenoeg geen verschil in ijzerabsorptie tussen de behandelingen met en zonder lactoferrine en nam de ijzerabsorptie niet toe met een grotere dosis aan lactoferrine. Wij zijn daarom van mening dat onder de condities van het uitgevoerde experiment een positieve werking van lactoferrine op de ijzerabsorptie zeer onwaarschijnlijk is.

Niet-verteerbare koolhydraten

Niet-verteerbare koolhydraten zijn voedingsbestanddelen welke niet worden verteerd door enzymen in het maag-darmkanaal, maar uiteindelijk wel worden afgebroken door bacteriën in het laatste deel van de darmen. Bij deze afbraak komen bepaalde stoffen vrij, waaraan gezondheidsbevorderende eigenschappen worden toegekend, zoals bijvoorbeeld een positief effect op het maag-darmkanaal (laxerend effect) en op het functioneren van het lichaam in het algemeen (verlaging serum cholesterol, toename van de glucose tolerantie). Uit experimenten met ratten blijkt verder dat niet-verteerbare koolhydraten de ijzer-, calcium- en magnesiumabsorptie stimuleren. Dit laatste hebben we nagegaan bij de mens.

In onze experimenten zijn de niet-verteerbare oligosacchariden, inuline, galacto- en fructo-oligosacchariden, alsmede het niet verteerbare disaccharide, lactulose onderzocht.

Oligosacchariden

Er wordt geschat dat Europeanen via hun voeding vijf gram van de niet-verteerbare oligosacchariden per dag eten. De belangrijkste bron is tarwe, gevolgd door ui en banaan. In ons eerste experiment is de ijzer- en calciumabsorptie gemeten bij volwassen mannen (20-30 jaar), die 15 g van de volgende oligosacchariden, inuline, fructo-oligosacchariden en galacto-oligosacchariden extra innamen. Uit de resultaten van dit onderzoek, beschreven in hoofdstuk 6, kan worden geconcludeerd dat deze oligosacchariden geen positief, noch een negatief effect hebben op de ijzer- en calciumabsorptie bij deze proefpersonen.

Het is verklaarbaar waarom een positief effect van oligosacchariden op de ijzerabsorptie niet werd gevonden. Het onderzoek werd uitgevoerd bij mannen met een goede ijzerstatus. Onder deze omstandigheden van een goede ijzerstatus, zal de ijzerabsorptie in de darm bijzonder laag zijn, doordat de darm dan een barrière opwerpt tegen de absorptie van ijzer. Accumulatie van ijzer in het lichaam kan schadelijke effecten hebben en daarom is verhoging van de ijzer absorptie dus feitelijk ongewenst. Dit kan verklaren waarom in ons onderzoek geen effect van oligosacchariden op de ijzerabsorptie werd gevonden.

Bij calciumabsorptie ligt dit heel anders. Er wordt wel gesuggereerd dat oligosacchariden met name positief werken op de calciumabsorptie in de dikke darm (het laatste deel van de darmen). In de door ons toegepaste methode om calciumabsorptie te meten werd de verrijking met stabiele isotopen gemeten in urine, verzameld gedurende 24 uur na isotoop toediening. Het kan zijn dat 24 uur niet lang genoeg was voor de meting van de totale calciumabsorptie. Daarom werd in een tweede experiment de urineverzameling verlengd tot 36 uur. Dit keer waren de proefpersonen 12 jongens in de leeftijd van 14 tot 16 jaar. Op deze leeftijd is de calciumbehoefte verhoogd door de groei, waardoor een positief effect op de absorptie misschien beter tot uiting kan komen. Zoals in hoofdstuk 7 te lezen valt, werd nu wel een positief effect van 15 g fructo-oligosacchariden op de calciumabsorptie gevonden. Mogelijk is dit positieve effect dus afhankelijk van de calciumbehoefte en/of vindt het effect inderdaad voornamelijk plaats in de dikke darm.

Bij 7 van deze jongens is ook het effect van fructo-oligosacchariden op de magnesium uitscheiding onderzocht (zie hoofdstuk 9). Door omstandigheden (o.a. te weinig geleverde stabiele isotopen) kon het effect op de magnesiumabsorptie niet worden gemeten. Daarom is alleen een stabiel magnesiumisotoop gegeven met de voeding. Wanneer wordt aangenomen dat de uitscheiding van geïnjecteerd en geabsorbeerd magnesium op dezelfde wijze door fructo-oligosacchariden wordt beïnvloedt, zeggen verschillen in de uitscheiding van het gegeven isotoop iets over de magnesium absorptie. Wij vonden een verhoging van de uitscheiding van het isotoop als gevolg van de behandeling met oligosacchariden, maar deze was niet significant. Aangezien het onderzoek werd uitgevoerd met een klein aantal proefpersonen kan een positief effect niet worden uitgesloten, temeer daar bij deze zelfde jongens wel een positief effect werd gevonden op de calcium absorptie.

Lactulose

Lactulose, een synthetisch disaccharide, bereikt net als oligosacchariden bijna in zijn geheel de dikke darm en wordt daar gefermenteerd. Lactulose kan waarschijnlijk via hetzelfde mechanisme als oligosacchariden de calciumabsorptie beïnvloeden. Dit

werd onderzocht bij postmenopausale vrouwen, een bevolkingsgroep die veel baat zouden hebben bij een 'functional food' dat de calciumabsorptie verhoogt. Zij kregen naast een controlebehandeling zonder lactulose, gedurende 9 dagen, een drank met 5 of 10 g lactulose aangeboden. De volgorde van de drie behandelingen werd door toeval bepaald. Het bleek dat 10 g lactulose per dag inderdaad de calciumabsorptie bij deze vrouwen verhoogt, zonder dat dit gepaard gaat met een toename van de calciumuitscheiding in de urine. Dit laatste kan inhouden dat het extra calcium dat wordt opgenomen, ten gevolge van het lactulose, ten goede komt aan de botten. Verder bleek de calciumabsorptie toe te nemen bij een hogere dosis lactulose.

Een vervolgonderzoek naar het mechanisme achter het positieve effect van lactulose en de andere niet-verteerbare koolhydraten op de calciumabsorptie is aan te bevelen. Verder zou het interessant zijn om te onderzoeken of het extra calcium dat wordt opgenomen uit de voeding ten gevolge van lactulose en fructo-oligosacchariden, daadwerkelijk benut wordt voor botopbouw.

Conclusies

Uit de resultaten van dit proefschrift kan het volgende worden geconcludeerd:

- Bij het bepalen van de ijzerabsorptie met behulp van de dubbel-label techniek kan een 3 keer zo hoge verrijking van rode bloedcellen met stabiele ijzerisotopen worden verkregen, wanneer jonge rode bloedcellen hiervoor worden geïsoleerd. Hierdoor kan de ijzerabsorptie goedkoper en onder meer fysiologische omstandigheden worden gemeten.
- Bij vrouwen met een lage ijzerstatus heeft lactoferrine zeer waarschijnlijk geen positief effect op de ijzerabsorptie.
- Bij jongens in de leeftijd van 14 tot 16 jaar verhoogt 15 g fructo-oligosacchariden per dag de calciumabsorptie. Verder maken de resultaten uit dit proefschrift duidelijk dat niet-verteerbare oligosacchariden zoals inuline, fructo- en galacto-oligosacchariden in ieder geval geen negatief effect hebben op de opname van ijzer, calcium en magnesium uit de voeding.
- Lactulose (10 g/d) stimuleert de calciumabsorptie bij postmenopausale vrouwen.